

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

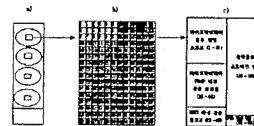
(11)Publication number: 1020030030266 A
(43)Date of publication of application: 18.04.2003(21)Application number: 1020010062125
(22)Date of filing: 09.10.2001(71)Applicant: KIM, CHEOL MIN
PARK, HEE KYUNG
SJ HIGHTECH CO., LTD.
(72)Inventor: JANG, HYEON JEONG
KIM, CHEOL MIN
PARK, HEE KYUNG
SONG, EUN SIL

(51)Int. Cl. C12Q 1/68

(54) MICROARRAY COMPRISING PROBES FOR MYCOBACTERIA GENOTYPING, M. TUBERCULOSIS STRAIN DIFFERENTIATION AND ANTIBIOTIC-RESISTANCE DETECTION

(57) Abstract:

PURPOSE: A microarray comprising probes for mycobacteria genotyping, M. tuberculosis strain differentiation and antibiotic-resistance detection is provided, thereby decreasing the time and costs required for analysis. **CONSTITUTION:** The microarray comprises a probe for tuberculosis or non-tuberculosis mycobacteria genotyping, a probe for M. tuberculosis strain differentiation and a probe for antibiotic-resistance detection in a support, wherein the probe for tuberculosis or non-tuberculosis mycobacteria genotyping contains an oligonucleotide of the nucleotide sequence of Mycobacteria sp. specific internal transcribed spacer(ITS), an oligonucleotide of the nucleotide sequence of tuberculosis Mycobacteria genus specific ITS, and an oligonucleotide of the nucleotide sequence of non-tuberculosis Mycobacteria genus specific ITS; the probe for M. tuberculosis strain differentiation contains an oligonucleotide of the M. tuberculosis strain specific direct repeat(DR) nucleotide sequence; and the probe for antibiotic-resistance detection contains an oligonucleotide of the nucleotide sequence of rpoB gene inducing the rifampin resistance, an oligonucleotide of the nucleotide sequence of katG gene inducing the isoniazid resistance, an oligonucleotide of the nucleotide sequence of pncA gene inducing the pyrazinamide resistance.



copyright KIPO 2003

Legal Status

Date of request for an examination (20011009)

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2003 - 0030266
(43) 공개일자 2003년04월18일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0062125
(22) 출원일자 2001년10월09일

(71) 출원인 주식회사 에스제이하이테크
부산 부산진구 범천1동 849 - 2
김철민
부산 수영구 남천2동 148번지 삼익비치아파트 211 - 811
박희경
서울 성북구 성북2동 60 - 1

(72) 발명자 김철민
부산 수영구 남천2동 148번지 삼익비치아파트 211 - 811
박희경
서울 성북구 성북2동 60 - 1
장현정
부산광역시남구문현3동395번지삼성아파트105동1402호
송은실
부산광역시남구문현4동1026 - 10번지24통3반

(74) 대리인 이영필
이해영

심사청구 : 있음

(54) 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는마이크로어레이와 이를 이용한 검출 방법 및 진단 키트

요약

본 발명은 지지체에 부착된 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브(probes), 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브, 및 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이와 이를 이용한 검출 방법 및 진단 키트에 관한 것이다.

본 발명에 따른 마이크로어레이는 마이코박테리아의 균주 감별(genotyping), 결핵균의 스트레인 감별(strain differentiation)과 항생제 내성 검출을 위해서 특이적으로 결합 반응할 수 있는 프로브를 모두 포함하고 있을 뿐만 아니라, 이들을 한 세트로 하여 하나의 지지체 위에 다수의 세트로 부착하여 단 1회의 실험으로 다수의 검체로부터 동시에 마이코

박테리아의 균주감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출이 가능하며, 배양된 균뿐만 아니라 임상 검체를 이용하여 신속하고 정확한 진단이 가능하다.

대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1의 a)는 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출을 위한 프로브를 한 세트로 하여 하나의 지지체에 다수 세트로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이고, b)는 a)중 한 세트의 프로브로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이고, c)는 b)의 마이크로어레이를 프로브 기능별로 구획을 나눈 도면이고,

도 2는 한번의 실험으로 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 동시에 검출하기 위한 각 프로브들의 특이적 혼성화 반응의 결과이고,

도 3은 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과로서, a)는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv에 대한 것이고, b)는 마이코박테리움 스크로푸레시움에 대한 것이고,

도 4는 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과로서, a)는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv에 대한 것이고, b)는 마이코박테리움 보비스(M. bovis)에 관한 것이고,

도 5는 마이코박테리아의 리팜핀, 아이소니아지드와 피라진아마이드 항생제 내성 검출을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과로서, a) 및 b)는 RMP 내성 검출을 위한 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv(RMP 감수성 균주) 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스(RMP 내성 균주)에 대한 것이고, c) 및 d)는 INH 내성 검출을 위한 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv(INH 감수성 균주) 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스(INH 내성 균주)에 대한 것이고, e) 및 f)는 PZA 내성 검출을 위한 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv(PZA 감수성 균주) 및 마이코박테리움 투베르쿨로시스(PZA 내성 균주)에 대한 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 동시에 검출할 수 있는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 지지체에 부착된 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브(probes), 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브, 및 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이와 이를 이용한 검출 방법 및 진단 키트에 관한 것이다.

< 마이코박테리아 균주 감별을 위한 종래방법 >

마이코박테리아는 인간에게 감염 질병을 일으키는 중요한 병원성 인자의 하나로, 매년 전세계적으로 8백만 명이 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염되며 3백만 명 이상의 사망자가 발생하고 있다(Raviglione, M. C., D. E. Snider, 및 A. Kochi. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. J

AMA, 273: 220 - 226(1995)). 최근에는 후천성면역결핍증(ADIS) 환자가 급속히 확산됨에 따라 결핵균 이외의 비결핵 마이코박테리아 (NTM: non - tuberculosis mycobacteria) 군중에 의한 감염증이 점차 증가하고 있다 (Barnes, P., A. B. Bloch, P. T. Davidson, 및 D. E. Snider, Jr. Tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. N. Engl. J. Med, 324: 1644 - 1650(1991)). 이와 같은 이유로, 결핵균뿐만 아니라 비결핵 마이코박테리아도 신속하면서도 효율적으로 균주 감별 및 진단하는 방법을 개발할 것이 절실히 요구되고 있다.

미생물을 감별하고 분류하기 위한 이전의 방법들은 미생물의 형태학적, 생화학적, 그리고 성장 특성에 근거하고 있다. 이러한 방법들은 번거롭고 복잡하며, 장시간이 소요된다는 등의 문제점들이 있다. 결핵의 진단은 문진, 임상 증상, X선 검사, 투베르쿨린 반응 검사, 혈액검사 및 세균검사 등으로부터 종합적으로 판단하고 행해지고 있다. 종래는, 환자의 객담 시료중의 결핵균을 염색하고 현미경으로 관찰한 도말 염색 검사법과 시험관 가운데에서 결핵균을 증식시키는 배양 검사법이 실시되어 왔다. 그러나, 도말 염색 검사법으로는 시료 중에 결핵균의 수가 적을 경우 검출할 수 없다. 또, 배양 검사법으로는 결핵균의 발육이 느리기 때문에 약 6주간 정도의 기간이 필요하다는 등의 단점이 있다. 최근에는 유전자를 표적으로 하는 빠르면서도 보다 간편한 방법들이 점차 많이 사용되고, 또 새롭게 개발되고 있는데, 이 방법에서는 특정 유전자를 대상으로 속 특이적(genus - specific) 혹은 균종 특이적 (species - specific) PCR 프라이머나 핵산 프로브 등을 이용하고 있다.

이러한 배경 하에서 균종 감별의 근거를 제공할 수 있는 마이코박테리아의 계통분석은 16S rRNA 또는 그 염기서열의 비교를 통하여 이루어졌다. 이는 16S rRNA 유전자가 중간에 매우 보존적이면서도 다양성을 가지고 있다는 사실에 근거한다(Stahl, D. A., 및 J. W. Urbance. The division between fast and slow - growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J. Bacteriol. 172: 116 - 124(1990); Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr 및 E. C. Bottger. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 323 - 30(1990b); Rogall T., T. Flohr, 및 E. C. Bottger. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. J. Gen. Microbiol. 136(Pt 9): 1915 - 1920(1990a)). 그러나, 16S rRNA 유전자는 일부 종간의 높은 염기서열 유사성을 가지고 있기 때문에 균종 감별에 어느 정도의 한계점을 가지고 있다(Fox, G. E., J. D. Wisotzkey. 및 P. J. Jurtshumk. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 166 - 170(1992)).

또한, IS6110 삽입 유전자(insertion element)도 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스(M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. microti)에서 다수의 복제수로 존재하므로 이를 표적으로 한 PCR 탐지법도 사용되고 있으나, 이 삽입 유전자를 갖지 않는 결핵균이 보고되어 위음성의 결과가 나타날 수도 있다는 것이 보고되었다(Yuen L. K., B. C. Ross, K. M. Jackson 및 B. Dwyer. Characterization of Mycobacterium tuberculosis strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 31: 1615 - 1618(1993)). 이 유전자를 증폭시키는 프라이머는 현재 국내에서도 상품화되어 있지만(TB - PCR, TB Detection Kit, (주)바이오니아, 대한민국), 이들은 매우 한정적인 균종에만 국한된 것으로 TB 복합체의 존재만을 탐지하는 PCR 키트이다.

결핵균 이외의 비결핵균(NTM)들에 의한 감염 예가 증가하고, 비결핵균 중에서도 이전에는 알려지지 않았던 새로운 균종에 의한 인체감염증이 계속 나타남에 따라, 이들의 최선의 예방과 치료를 위해서 질병을 유발하는 균종을 정확히 규명해야한다. 이를 위해서 각 균종에 특이적인 유전자상의 차이에 의한 새로운 균주 감별 및 진단 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

< 결핵균의 스트레인 감별을 위한 종래방법 >

결핵균의 스트레인 감별은 결핵균의 아종을 감별하는 것으로 결핵 발생 시에 그 환자에게 감염된 결핵균의 스트레인을 감별하여 감염원을 찾아내고 감염된 결핵균의 스트레인 종류에 따라 환자별 특성을 분류하여 보건학적인 적절한 조치를 취할 수 있게 한다. 이는 결핵전문 의료기관과 집단 결핵 감염의 위험이 높은 의료시설의 환자를 관리하는데 매우 유효하다. 따라서, 다제내성 결핵의 발병 기원 파악과 결핵의 전파를 막기 위한 다제내성 결핵균의 역학적 연관성 발견을 위한 방법의 필요성도 절실히 요구되고 있다. 이러한 요구의 필요성에 의한 스트레인 감별 방법으로 기존에는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 DNA 단편의 PCR 증폭을 기초로하는 방법으로서 PCR로 증폭된 IS6110의 특정 제한효소 인식 부위를 이용한 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 방법을 이용하였다. 그러나, DNA RFLP 방법은 정교한 기계 조작이 요구되며, 배양된 균체의 DNA를 이용하기 때문에 증식속도가 느린(slow - growing) 개체에는 부적당하다(Goyal M., Saunders N. A., van Embden J. D., Young D. B., Shaw R. J. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 35: 647 - 651(1997)).

그 외 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스를 구별하는 방법으로는 genomic DNA의 southern blotting에 의한 DNA fingerprinting, PGRS(polymorphic GC - rich sequence), 그리고 triplet multimer(GTG)등의 반복성 요소(repetitive element)를 이용한 방법들이 있으나, 이러한 방법들은 PCR 증폭을 위한 프라이머에 대한 표적 DNA의 다형성과 크기가 매우 다양하기 때문에 임상검체에서의 동시 추출과 균주감별에는 적절하지 못한 방법들이다(Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, 및 van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol, 35: 907 - 14(1997)).

현재, 마이코박테리움 투베르쿨로시스 내에 존재하는 DR(direct repeat) locus와 DR locus내에 다양한 길이로 산재하는 비반복성 스페이스(nonrepetitive spacer)를 이용한 스트레인 감별(strain differentiation)을 위한 miniblottter가 상품화되어 있지만(MiniSlot apparatus, Immunetics, Inc. USA), 혼성화 반응과 검출 등 실험절차가 많고 결과를 얻는데 약 2 - 3일이 소요되는 번거로운 방법이다(van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., van Der Zeijst B.A. 및 Schouls L.M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. J. Bacteriol, 182: 2393 - 401 (2000); Filliol I., Sola C. 및 Rastogi N. Detection of a previously unamplified spacer within the DR locus of Mycobacterium tuberculosis: epidemiological implications. J. Clin. Microbiol, 38: 1231 - 1234(2000)).

< 결핵균의 항생제 내성을 검출을 위한 종래방법 >

항생제 오·남용으로 인한 다제내성 결핵은 인류가 건강한 생활을 하는데 큰 장애물이 되고 있다. 개발도상국에서는 항결핵제의 부족으로 인한 부적절한 치료로 항생제 내성균을 가진 만성 보균자가 증가되었다. 최근 5년간 35개국에서의 항생제 내성 결핵균에 대한 조사에 의하면 한가지 이상의 약제에 내성을 가지는 경우가 13%에 이르고, 아이소니아지드(isoniazid, INH)와 리팜핀(rifampin, RMP)을 포함한 2가지 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제내성결핵(multidrug - resistant M. tuberculosis, MDR - TB)이 약 7.5%로 심각한 수준에 이르고 있다. 이처럼 결핵, 그 중에서도 항생제 내성 결핵은 인류의 건강한 생활을 영위하는데 큰 위협이 되고 있다(Musser J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev, 8: 496 - 514(1995); 장철훈, 손한철, 김철민. 다제내성 결핵균과 감수성 검사. 대한화학요법학회지, 16: 187 - 203(1998)). 항생제 내성 결핵균의 출현과 더불어 결핵 환자와 관련된 또 다른 중요한 변화는 질병의 진행 양상이다. 1980년대 후천성 면역결핍증 환자의 증가가 결핵 환자의 급증으로 이어졌고 면역 능력이 저하된 환자가 늘어나면서, 만성 질환인 결핵이 급격하게 진행되는 경우가 많아졌다. 그리고 결핵의 유병률이 낮아짐에 따라 새로 발생하는 환자가 주로 무증상 잠복 환자의 재활성화였으나, 요즘에는 면역 능력이 저하된 환자들에서 사람 대 사람간의 전파가 다시 늘어나고 있다(Mycobacteria. In: Koneman E

W, Allen SD, et al. eds. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. p894 - 895, Philadelphia, Lipincott, 1997). 따라서 결핵균의 약제 내성을 조기에 진단하는 것은 환자 개개인의 치료뿐만 아니라 내성 결핵균의 전파 예방에 매우 중요하다. 따라서 이러한 다제내성 결핵의 효과적인 치료와 다제내성균의 출현 빈도를 최대한으로 억제하기 위해서 조기 진단 방법과 항생제 감수성 여부를 신속하게 결정하기 위한 방법의 개발 필요성이 요구되고 있다.

결핵균의 항생제 감수성 검사로 현재 많은 검사실에서는 표준적인 결핵균 검출방법으로 우선 항산균(acid fast bacteria) 도말법이나 조직의 항산균 염색을 실시한 후 균 배양을 하고 배양된 균에서 결핵임을 확인하기 위한 생화학적 검사를 시행한다(Kent B.D., Kubica G. P. Public health mycobacteriology; a guide for the level III laboratory. US department of health and human services. Atlanta:Centers for Disease Control, 207(1985)). 이 과정은 검체 채취로부터 결핵균 균주 감별 시까지 4~6주가 소요된다. 또한, 배양된 결핵균의 항생제 감수성 검사는 8~12주의 기간을 요하는 Middlebrook 배지를 이용하므로 항생제 내성 결핵균의 조기 진단에 어려움이 있다(이미애, 객담에서 중합효소연쇄반응과 Line Probe Assay를 이용한 rifampin 내성 결핵균의 직접검출법. 대한임상병리학회지, 18: 71 - 76(1998)).

또한, 분자생물학적 방법에 의한 항생제 내성기전에 대한 연구가 활발히 진행되어 리팜핀(rifampin, RMP), 아이소니아지드(isoniazid, INH), 피라진아마이드(pyrazinamide, PZA), 에탐부톨(ethambutol, EMB), 스트렙토마이신(streptomycin, STR), 플로퀴놀론(fluoroquinolone, FQ), 카나마이신(kanamycin), 그리고 아미카신(amikacin) 내성을 유도하는 다수의 유전적 변화가 보고되었다. 그러나, 아직까지 이러한 항생제의 염기서열 변화를 이용하여 한번의 실험으로 다양한 돌연변이를 검출할 수 있는 방법은 발표되지 않고 있다.

이상에서 보여지듯이, 전세계적으로 마이코박테리아에 의한 많은 수의 감염 환자와 사망자가 발생하고 있으며, 최근에는 후천성면역결핍증 환자의 급속한 증가로 인해 결핵뿐만 아니라 비결핵 마이코박테리아에 의한 감염증도 점차 증가하고 있으며, 항생제의 오·남용으로 인한 다제내성 결핵의 출현으로 심각성이 증가되고 있다. 따라서, 결핵균과 비결핵 마이코박테리아의 신속하면서도 효율적인 균주감별 및 진단, 결핵균의 역학적 연관성과 항생제 내성 결핵균의 검출을 위한 방법이 절실히 요구되고 있다. 그럼에도, 현재는 마이코박테리아 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 조사하는 실험이 개별적으로 진행되고 있어 조속한 검사 결과를 요하는 실험에서 장시간이 소요된다는 큰 단점을 가지고 있다.

이에, 본 발명자들은 최소한 6주 이상의 장시간이 소요되는 기존의 균 배양 및 생화학적 동정 방법이 가지고 있던 단점과 비효율성을 개선하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 조사하기 위하여 각각에 대하여 특이적으로 결합 반응할 수 있는 프로브를 모두 포함하고 있는 마이크로어레이를 개발함으로써, 배양된 균뿐만 아니라 임상 검체에서도 한번의 실험으로 신속하고 정확한 진단이 가능함을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 한번의 실험으로 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성에 대한 신속하고 정확한 진단을 가능하게 하는 마이크로어레이를 제공하는 데 있다.

또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 마이크로어레이를 이용한 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 검출방법 및 진단키트를 제공하는 데 있다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마이크로어레이에 사용 가능한 프로브 또는 프라이머용 올리고뉴클레오티드를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지지체에 부착된 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브(probes), 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브, 및 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이를 제공한다.

본 발명에서, 지지체는 마이크로어레이의 제작에 통상적으로 사용되는 슬라이드글라스, 멤브레인, 반도체 칩(semiconductive chip) 또는 실리콘(silicon) 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

바람직하게는, 본 발명의 마이크로어레이는 하나의 지지체에 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 검출하는 프로브(probes)를 한 세트 또는 다수의 세트로 포함하는 것을 특징으로 한다. 이로써, 단 1회의 실험으로 다수의 검체로부터 동시에 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출을 신속하고 정확하게 할 수 있다.

본 발명에서, 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브는 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 표적 유전자에 특이적으로 결합 반응할 수 있는 염기서열, 예를 들면, 이미 보고된 16S rRNA와 IS6110, HSP, SOD 유전자 등의 표적 염기서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오티드도 포함하나, 바람직하게는 마이코박테리아 속 특이적인 ITS(Internal Transcribed Spacer) 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 결핵 마이코박테리아 중 특이적인 ITS 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 및 비결핵 마이코박테리아 중 특이적인 ITS 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 내지 9의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 서열번호 10 내지 16의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 및 서열번호 17 내지 89의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에서, 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 표적 유전자인 ITS(Internal Transcribed Spacer region)는 마이코박테리아의 16S rRNA와 23S rRNA 사이에 존재하는 것으로서 균주의 종류에 따라 크기에 차이가 있어 약 300~500 bp 크기이며, 마이코박테리아에만 존재하는 보존적인 염기서열 지역과 속에 따라 특이적인 염기서열 지역이 고르게 분포하고 있어 이를 표적 염기서열로 하여 동정 프라이머(프로브) 제작에 좋은 조건을 갖추고 있는 내부전사부위이다(Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W 및 Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S - 23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J. Clin. Microbiol. 36: 139(1998); Park H.K., Jang H.J., Kim C.M., Chung B.S., Chang C.H., Park S.K., 및 Song S.D. Detection and identification of mycobacteria by amplification of the internal transcribed spacer regions with genus - and species - specific PCR primers. J. Clin. Microbiol. 38: 4080 - 4085(2000)).

본 발명의 마이코박테리아 균주 감별을 위한 마이크로어레이(microarray)는 다형성(polymorphism) 정도가 높은 지역인 ITS를 표적 염기서열로 각각의 마이코박테리아 속 특이적이며 종 특이적인 프로브를 제작하여 이를 지지체에 부착하여 제작하였다. ITS를 포함할 수 있는 양쪽 보존지역(conserved sequence)에서 프라이머를 정하여 증합효소연쇄반응으로 증폭시켜 마이크로어레이에서 혼성화 반응에 의해 나타나는 신호를 분석하여 동정하였다. 또한 중복감염의 경우에도 다수의 균주가 동시에 동정될 수 있으므로 기존의 검사법에서는 동정이 어려운 중복감염의 진단이 가능하다.

본 발명에서, 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브는 결핵균의 스트레인의 표적 유전자에 특이적으로 결합 반응할 수 있는 염기서열, 예를 들면, 이미 보고된 IS6110, 반복성 요소인 PGRS(polymorphic GC - rich sequence)와 GTG(triples) 등의 표적 염기서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오타이드도 포함하나, 바람직하게는 결핵균의 스트레인 특이적 DR(direct repeat) 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 90 내지 134의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

본 발명에서의 결핵균의 스트레인 감별 방법은 마이코박테리움 투베르쿨로시스 내에 존재하는 DR(direct repeat) locus와 DRs 내에 다양한 길이로 존재하는 비반복적 스페이스(nonrepetitive spacer)를 표적으로 하여 마이크로어레이를 제작하여 이루어졌다. 스폴리고타이핑 방법처럼 결핵균의 스트레인별 DR locus의 다양성에 기초하였다. PCR을 이용하여 in vitro에서 중폭한 결핵균의 스트레인에 의존한 혼성화 반응에 기초한 방법으로 기존의 상품화된 방법보다 단 시간에 정확하고 편리한 방법으로 결핵균의 스트레인을 감별할 수 있다.

본 발명에서, 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브는 항생제 내성을 유도하는 표적 유전자에 특이적으로 결합 반응할 수 있는 염기서열, 예를 들면, 리팜핀(rifampin, RMP), 아이소니아지드(isoniazid, INH), 피라진아마이드(pyrazinamide, PZA), 에탐부톨(ethambutol, EMB), 스트렙토마이신(streptomycin, STR), 플로퀴논론(fluoroquinolone, FQ), 카나마이신(kanamycin), 그리고 아미카신(amikacin) 등에 대한 내성을 유도하는 표적 염기서열을 갖는 어떤 올리고뉴클레오타이드도 포함하나, 바람직하게는 리팜핀 내성을 유도하는 rpoB 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 아이소니아지드 내성을 유도하는 katG 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드, 피라진아마이드 내성을 유도하는 pncA 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 서열번호 135 내지 160의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오타이드, 서열번호 161 내지 169의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오타이드, 서열번호 170 내지 173의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

RMP와 INH 모두에 내성을 보이는 다제내성 결핵균 중 RMP 내성 균주의 94~98%가 rpoB 유전자에 의해 암호화되는 DNA 의존성 RNA 중합효소 β subunit의 제한된 지역 내의 점돌연변이(point mutation)에 의해 생기므로 DNA 혼성화 반응(hybridization)과 역 혼성화 반응(reverse hybridization)을 이용하여 쉽게 확인할 수 있다(이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석, 김철민, 및 박순규. 염기서열결정과 Line Probe 분석법에 의한 리팜핀 내성 결핵균의 rpoB 유전자 분석. 결핵 및 호흡기 질환, 44: 251 - 263(1997); Rossau R., Traore H., De Beenhouwer H., Mijs W., Jannes G., De Rijk P., Portaels F. Evaluation of the INNO - LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother, 41: 2093 - 2098(1997) 참조).

또 다른 항생제인 INH는 주로 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스에 의한 감염 치료에 주로 이용되는 항생제로 비결핵 마이코박테리아와 원핵생물(prokaryote)에서는 내성을 나타낸다. INH 내성 결핵균의 약 84%가 katG 돌연변이 또는 inhA의 상류 뉴클레오타이드(upstream nucleotide) 치환에 의한 것으로 75%가 catalase - peroxidase 효소의 유전자인 katG 유전자 일부의 구조 변화에 의한 기능 저하 또는 기능 상실이 주로 발견되고 있다. 그중 코돈 315 부위의 serine(AGC)이 threonine(ACC)과 asparagine(AAC)으로, 코돈 463 부위의 arginine(CGG)이 leucine(CTG)으로 치환된 돌연변이가 INH 내성에 중요한 기전으로 밝혀지고 있다(Musser J.M., Kapur V., Williams D.L., Kreiswirth B.N., van Soolingen D., van Embden J.D. Characterization of the catalase - peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid - resistant and - susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis. 173: 196 - 202(1996); Ramaswamy S., Musser J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in M

ycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis, 79: 3 - 29(1998) 참조).

다제내성 결핵에서 PZA 내성을 보이게 되면 치료가 어렵기 때문에 INH와 RMP의 내성뿐만 아니라 PZA의 내성에 대한 검출도 매우 중요하다. PZA는 결핵을 치료하는 1차 약제 중의 하나로, 피라진아미데아제(pyrazinamidase, PZase)에 의해서 활성형인 피라지노익 엑시드(pyrazinoic acid, POA)로 전환되어 살균 효과를 나타내고, 결핵균이 갖고 있는 PZase의 활성이 소실되면 그 결핵균은 PZA에 내성을 갖게 된다(Konno K., Feldmann F. M., McDermott W. P. pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 95: 461 - 469(1967)). PZA 내성에는 PZase를 만들어내는 유전자인 pncA 유전자 프로모터의 -11에 A가 G로 치환된 돌연변이가 중요한 PZA 내성 기전으로 보고되었다(Park S.K., Lee J.Y., Chang C.L., Lee M.K., Son H.C., Kim C.M., Jang H.J., Park H.K., 및 Jeong S.H. pncA mutations in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Korea. BMC Infectious Diseases 1: 4 - 8(2001) 참조).

본 발명에서의 항생제 내성 결핵균의 검출 방법은 분자유전학에 기초하여 각 항생제의 염기서열 변화에 의한 돌연변이 검출에 기초하였다. 각 항생제에서 표적 염기서열의 야생형과 돌연변이 검출을 위한 프로브를 고형지지체에 부착하여 마이크로어레이를 제작하였다. 한번의 실험으로 다양한 돌연변이 검출이 가능하며, 장시간이 소요되는 기존의 항생제 내성 결핵균 검출 방법에 비해 단시간에 정확한 돌연변이를 검출함으로써 조속한 항생제 내성 여부 확인으로 효과적인 결핵치료를 가능하게 하는 검사법이다.

상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별, 및 항생제의 내성 검출을 동시에 수행하는 검출 방법을 제공한다. 즉, 본 발명의 마이크로어레이를 제작하고, 여기에 배양된 균 또는 임상 검체로부터 분리된 표적 DNA를 혼성화 반응시킨 후, 표적 DNA와 프로브의 결합유무를 확인함으로써 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별, 및 항생제의 내성 검출을 동시에 수행할 수 있다.

상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 마이크로어레이를 포함하는 결핵 및 비결핵 마이코박테리아 감염 진단 키트를 제공한다. 본 발명의 진단 키트에는 본 발명의 마이크로어레이 외에 혼성화 반응용액, 표적유전자를 증폭하기 위한 프라이머가 포함된 PCR 키트, 비혼성화 반응 DNA 세척용 용액, 커버슬립, 염료, 비염료 결합 세척용 용액 및 사용설명서 등을 더 포함할 수 있다.

상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열 번호 1 내지 89의 염기서열을 포함한 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오타이드, 서열 번호 90 내지 134의 염기서열을 포함한 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오타이드 및 서열 번호 135 내지 173의 염기서열을 포함한 항생제 내성을 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명의 균주 감별용 올리고뉴클레오타이드는 마이크로어레이에 부착되는 프로브(probes)로서 뿐만 아니라 마이코박테리아 속 특이적이며 종 특이적인 표적 DNA의 PCR 증폭을 위한 프라이머(primers)로서도 사용이 가능하다. 따라서 본 발명의 균주 감별용 올리고뉴클레오타이드는 상기 서열번호들의 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) 염기서열을 모두 포함할 수 있다.

도 1은 본 발명의 바람직한 실시예인 마이크로어레이의 도면으로서, a)는 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출을 위한 프로브를 한 세트로서 하여 하나의 지지체에 다수 세트로 구성하고 있는 마이크로어레이의 도면이며, b)는 a)중 한 세트로서 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항

생체 내성을 검출하는 프로브 모두를 포함하는 마이크로어레이의 도면이며, c)는 b)의 마이크로어레이를 프로브 기능별로 구획을 나눈 도면이다. 도 1c에서, 마이크로어레이의 좌측상단에 마이코박테리아 균주 감별을 위한 프로브를 부착하고, 우측상단에 결핵균 스트레인 감별을 위한 프로브를 부착하고, 좌측중단, 좌측하단 및 우측하단에 각각 RMP 내성 검출, INH 내성 검출 및 PZA 내성 검출을 위한 프로브를 부착하고 있으나, 이것은 본 발명에 따른 프로브 구획의 한 예에 불과하므로 각 프로브 구획의 위치(layout)는 변동될 수 있다.

본 발명에서 개발된 마이코박테리아 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별 및 항생제 내성 검출을 위한 프라이머 및 프로브는 각각 표1, 표2 및 표3과 같다.

< 표1> 마이코박테리아 균주 감별을 위한 프라이머

동정 균주	프로브 이름	염기서열	서열번호
마이코박테리아 (Mycobacteria)	ITSF	CGAAGCCAGTGGCCTAACCC	1
	ITSR	GGATCCTGCCAAGGCATCCACCA	2
	MYC-01	TGGTGGGGTGTGGTGTGTTGA	3
	MYC-02	TGGATAGTGGTTGCGAGCAT	4
	MYC-03	TGGATAGTGATTGCGAGCAT	5
	MYC-04	TGGATAGTGCTTGCGAGCAT	6
	MYC-05	TGGATAGTGGTTGAGAGCAT	7
	MYC-06	TGGATAGTGGTTGGGAGCAT	8
TB COMPLEX	MTB-01	ATAAGTATTGCGAGC	9
	MTB-02	CACTCGGACTTGTCCAGGT	10
	MTB-03	TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA	11
	MTB-04	CAACAAAGTTGGCCA	12
	MTB-05	GGACTTGTTCAGGT	13
	MTB-06	AGGTGTTGTCCACC	14
	MTB-07	TGCATGACAACAAG	15
	MTB-07	AGGTGTTZTCCACC	16
. avium - M. intracellular (MAC)	MAC-01	CCCTGAGACAACACTCGGTC	17
	MAC-02	GCGTTCATCGAAATGTGTAAT	18
	MAC-03	CTCGGTGCAACCGTG	19
M. fortuitum	FOR-01	CCGTGAGGAACCGTTGCCT	20
	FOR-02	TAGCACGCGAATCGTGTGG	21
	FOR-03	GTAAGTGGGACGGTTTGGTG	22
	FOR-04	CAAACCTTTTGTACTGCCAG	23
	FOR-05	AGGCCCGTGCCCTTTTGGG	24
	FOR-06	TGGCATCCGTTGCGGGTGT	25
	FOR-07	GGTTTTGTGTGTTGATGTGC	26
M. chelonae	CHE-01	GTGGTTACTCGCTTGGT	27
	CHE-02	TTGGGAACATAAGCGAGTT	28
	CHE-03	CAATAGAATTGAAACGCTGGCA	29
	CHE-04	GTAAGTCGGCAAAACGTQGGGA	30
M. abscessus	ABC-01	TAAAGTAGGCATCTG	31
	ABC-02	GGATATCTACTTGGT	32
	ABC-03	TAAACATAGCCTCGCTCGTT	33
M. goodii	GOR-01	CGACAACAAGCTAAGCCAGA	34
	GOR-02	AAAATGTATGCGTTG	35
	GOR-03	TGTCGTTGCGGCAACGT	36
	GOR-04	CACCCCTCGGGTGCTGTC	37
M. kansasii	KAN-01	GCGCAACTGTAAATGAATCA	38
	KAN-02	CTGGATGCGCTGCCGTTG	39
	KAN-03	AACTGTAAATGAATCACCACAC	40
	KAN-04	GGACGAAAGCCGGTGCAC	41
	KAN-05	GCATCCCAACAAGTGGG	42
	KAN-06	CTCGGGCTCTGTTGAG	43
M. scrofulaceum	SCO-01	TCGGCTCGTTCTGAGTGGTG	44
	SCO-02	TAAACGGATGCGTGGCCGAA	45
M. szulgai	SZU-01	AACACTCAGGCTTGCCAGA	46
	SZU-02	CAATTGGATGCGCTGCCCTC	47
	SZU-03	GCGCGGCAACGAACAAGCCA	48
	SZU-04	AGGCTTGCCAGAGCTGTTG	49
M. vaccae	VAC-01	CGATTGTTGGATGGCTTT	50
	VAC-02	AATGCCGGCGAGGGAAAT	51
	VAC-03	GAATGCACAGCGCTTGTGGT	52
M. xenopi	XEN-01	GGGCCGAGGTGTTGGGCAG	53
	XEN-02	CAGGCAGTAACCGCCGGCAC	54
	XEN-03	TGTTGAGTGTGTTCTGGTGT	55
	XEN-04	AGACTGTGGTAAGCGGTTTTG	56

<i>M. terrae</i>	TER-01	CTTTTCCCCCGTGCCTCAC	57
	TER-02	CAACGTTGAAAACAAGATCGCC	58
	TER-03	AGGAGTCCTGGGGGTTTCT	59
	TER-04	GGCAACAGGCCCGTTTGTGC	60
<i>M. flavescens</i>	FLA-01	ACGTGTGGGGATCAGTGCG	61
	FLA-02	CACTGCTTTGAGGAATCATCAG	62
	FLA-03	CTGAACAGGTGGCTCCCTTT	63
<i>M. smegmatis</i>	SME-01	ACACTCTCCGTTGGGAGG	64
	SME-02	CTGTTTCGATGGACTGCCAG	65
	SME-03	CCGCGTTCCTCGTCCCGTTG	66
	SME-04	CGCATTGTTGCGGACAAATTG	67
<i>M. genavense</i>	GEN-01	AACAACAGGCAATCGCCGGA	68
	GEN-02	GTTCCCCAGTGGTGCGCGT	69
<i>M. malmøense</i>	MAL-01	TGGTGGGGTGCAAGCCGTGA	70
	MAL-02	TGCCCGTAGACGCGTATTG	71
	MAL-03	TGGGCCAGTCCGCGT	72
<i>M. simiae</i>	SIM-01	CACAACAACAGGCAATCGCCA	73
	SIM-02	ACTCGGCCGACTTCGGTTGA	74
	SIM-03	CGAGCATCTAATGAACGCGT	75
	SIM-04	CTTCGGTTGAAGTGG	76
<i>M. marinum - M. ulcerans</i>	MAR-ULC-01	AACAACAAGCAAGCCAGACAC	77
	MAR-ULC-02	GCAACATCTCTGTTGGTTTC	78
	MAR-ULC-03	CCTTTTGGTGGCGTGTCTGT	79
<i>M. gastri</i>	GAS-01	CAACAGCAAGCAAGCCA	80
	GAS-02	CGTCCAAGAGTGTG	81
	GAS-03	TTGTCTTGGACTCGT	82
	GAS-04	GCAGGGTAGCGTGTCTTTTG	83
	GAS-05	GTTGCCCGCAGGGTAGCG	84
	GAS-06	TGCCCGCAGGGTAGCGTGT	85
<i>M. leprae</i>	LEP-01	ACACTCTAAATAGTTTAG	86
	LEP-02	GCAAATATCCAGACAC	87
	LEP-03	TTGTCCCTCATCTTTGG	88
	LEP-04	AACACTCTAAATAGTTTAGGGTAT	89

< 표2> 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프라이머

프론트	염기서열	서열번호
DR-a	GGTTTTGGGTCTGACGAC	90
DR-b	CCGAGAGGGGACGGAAAC	91
SPO-01	ATAGAGGGTCGCCGTTCTGGATCA	92
SPO-02	CCTCATAATTGGCGACAGCTTTTG	93
SPO-03	CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA	94
SPO-04	ACGTATACGCCGACCAATCATCAG	95
SPO-05	TTTTCTGACCACCTTGTCGGGATTA	96
SPO-06	CGTCGTCATTTCGGGCTTCAATTTC	97
SPO-07	GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC	98
SPO-08	CGTGAAACCGCCCCAGCCTCGCCG	99
SPO-09	ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC	100
SPO-10	TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC	101
SPO-11	GTGAGCAACGGCGGGCGCAACCTGG	102
SPO-12	ATATCTGCTGCCGCCCCGGGAGAT	103
SPO-13	GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC	104
SPO-14	GGTGTGATGCGGATGGTCGGCTCGG	105
SPO-15	CTTGAATAACGCGCAGTGAATTTTG	106
SPO-16	CGAGTTCCGTCACGGTCGTAATC	107
SPO-17	GCGCCGGCCCCGCGGATGACTCCG	108
SPO-18	CATGGACCCGGCGAGCTGCAGATG	109
SPO-19	TAAGTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT	110
SPO-20	TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA	111
SPO-21	TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA	112
SPO-22	ACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA	113
SPO-23	AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG	114
SPO-24	CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG	115
SPO-25	GATCAGCGACCACCGACCCCTGTCA	116
SPO-26	CTTCAGCACCAACATCATCCGGCGC	117
SPO-27	GGATTCGTGATCTCTTCCCGCGGAT	118
SPO-28	TCGCCCCGGGTTTAGCGATCACAAC	119
SPO-29	AAATACAGGCTCCACGACACGACCA	120
SPO-30	GGTTGCCCCGCGCCCTTTTCCAGCC	121
SPO-31	TCAGACAGGTTTCGCGTCGATCAAGT	122
SPO-32	GACCAAATAGGTATCGGCGTGTTCA	123
SPO-33	GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA	124
SPO-34	AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA	125
SPO-35	TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC	126
SPO-36	CGAAATCCAGCACCAACATCCGCAGC	127
SPO-37	CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCTT	128
SPO-38	CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC	129
SPO-39	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG	130
SPO-40	CGCCATCTGTGCTCATACAGGTCC	131
SPO-41	GGAGCTTTCGGCTTCTATCAGGTA	132
SPO-42	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCAGC	133
SPO-43	CGCAGAATCGCACCGGTGCGGGAG	134

< 표3> 항생제 내성 검출을 위한 프라이머

표적 항생제	프로본	염기서열	서열번호
<i>rpoB</i> (리팜핀)	<i>rpoF</i>	TGCACGTCGCGGACCTCCA	135
	<i>rpoR</i>	TCGCCGCGATCAAGGAGT	136
	<i>rpo 511-WL</i>	AGCCAGCTGAGCCAA	137
	<i>rpo 511-MP</i>	AGCCAGCCGAGCCAA	138
	<i>rpo 513-WQ</i>	CTGAGCCAATTCATG	139
	<i>rpo 513-ML</i>	CTGAGCCTATTCATG	140
	<i>rpo 516-WD</i>	TTCATGGACCAGAAC	141
	<i>rpo 516-MV</i>	TTCATGGTCCAGAAC	142
	<i>rpo 516-MY</i>	TTCATGTACCAGAAC	143
	<i>rpo 522-WS</i>	CTGTCGGGGTTGAC	144
	<i>rpo 522-ML</i>	CTGTTGGGGTTGAC	145
	<i>rpo 526-WH</i>	TTGACCCACAAGCGC	146
	<i>rpo 526-MY</i>	TTGACCTACAAGCGC	147
	<i>rpo 526-MD</i>	TTGACCGACAAGCGC	148
	<i>rpo 526-MR</i>	TTGACCCGCAAGCGC	149
	<i>rpo 526-ML</i>	TTGACCCCTCAAGCGC	150
	<i>rpo 526-MP</i>	TTGACCCCAAGCGC	151
	<i>rpo 531-WD</i>	CGACTGTCGGCGCTG	152
	<i>rpo 531-ML1</i>	CGACTGTTGGCGCTG	153
	<i>rpo 531-ML2</i>	CCGAGCGCCAACAGTCGGC	154
	<i>rpo 531-MW1</i>	CGACTGTGGGCGCTG	155
	<i>rpo 531-MW2</i>	CCGACTGTGAGCGCT	156
	<i>rpo 531-MW3</i>	GCCGACTATGGGCGC	157
	<i>rpo 531-MW4</i>	CCGAGCGCCACAGTCGGC	158
	<i>rpo 0533-WL</i>	GGCGCTGGGGCCCGG	159
	<i>rpo 0533-MP</i>	GGCGCCGGGGCCCGG	160
<i>katG</i> (아이소니아지드)	<i>kat1F</i>	AAGAGCTCGTATGGCACCGG	161
	<i>kat2R</i>	AGCGCCAGCAGGGCTCTTC	162
	<i>kat3F</i>	GGCGAAGCCGAGATTGCCAG	163
	<i>kat4R</i>	CTGCAGGCGGATGCGACCA	164
	<i>kat 315-WS</i>	ATCACCAGCGGCATC	165
	<i>kat 315-MT</i>	ATCACCACCGGCATC	166
	<i>kat 315-MN</i>	ATCACCACCGGCATC	167
	<i>kat 463-WR</i>	CAGATCCGGGCATCG	168
	<i>kat 463-ML</i>	CAGATCCTGGCATCG	169
<i>pncA</i> (피라진아마이드)	<i>pncF</i>	GCTGGTCATGTTGCGATCG	170
	<i>pncR</i>	ACCGGTTACCGCCAGCGAG	171
	<i>pnc-11-W</i>	ACGTATGGTGGACGT	172
	<i>pnc-11-M</i>	ACGTGTGGTGGACGT	173

이하, 실시 예를 기초로 하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 단, 이들 실시 예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 만으로 제한되는 것은 아니다.

실시 예 1: 마이코박테리아 균주의 배양 및 제놈 DNA 분리

마이코박테리아 표준 균주는 유전자은행 (Korean Collection for Type Culture, KCTC) 과 ATCC (American Type Culture Collection) 에서 확보하고 대한결핵협회와 마산결핵병원을 통해서 임상 검체를 확보하였으며 이들의 DNA를 추출하기 위해서는 인스타진 매트릭스 (InstaGene matrix, Bio - Rad Co., USA) 를 사용하였다.

균주 및 임상 검체는 1.5 ml 튜브에 인스타진 매트릭스 200 μ l를 가하였다. 그리고, 본 실험에 사용할 균주를 고체 배지 (Ogawa 배지) 에서 배양한 후 1 백금이를 따서 인스타진 매트릭스가 들어 있는 튜브에 넣어 부유시켰다. 이것을 56 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 반응시킨 후 10 초 동안 잘 혼합되도록 섞고, 다시 100 $^{\circ}$ C에서 8 분 동안 열처리한 후 10 초 동안 잘 섞었다. 혼합물을 12,000 rpm에서 3분 동안 원심분리하여 분리된 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 이를 PCR 반응의 주형 DNA로 사용하였다.

사용된 표준 균주는 다음과 같다:

마이코박테리움 투베르쿨로시스 (*M. tuberculosis*) H37Rv (ATCC 27294)

마이코박테리움 포튜이툼 (*M. fortuitum*) (ATCC 6841)

마이코박테리움 플라베센스 (*M. flavescence*) (ATCC 14474)

마이코박테리움 아비움 (*M. avium*) (ATCC 25291)

마이코박테리움 인트라셀룰라 (*M. intracellulare*) (ATCC 13950)

마이코박테리움 칸사시 (*M. kansasii*) (ATCC 12478)

마이코박테리움 첼로네 (*M. chelonae*) (ATCC 35752)

마이코박테리움 엠서수스 (*M. abscessus*) (ATCC 19977)

마이코박테리움 스줄가이 (*M. szulgai*) (ATCC 35799)

마이코박테리움 스크로푸레시움 (*M. scrofulaceum*) (ATCC 19981)

마이코박테리움 고도네 (*M. gordonae*) (ATCC 14470)

마이코박테리움 베체 (*M. vaccae*) (ATCC 15483)

마이코박테리움 제노피 (*M. xenopi*) (ATCC 19250)

마이코박테리움 스메그마티스 (*M. smegmatis*) (ATCC 21701)

마이코박테리움 제네벤스 (*M. genavense*) (ATCC 51233)

마이코박테리움 말모엔스 (*M. malmoense*) (ATCC 29571)

마이코박테리움 시미에 (*M. simiae*) (ATCC 25275)

마이코박테리움 마리넘 (*M. marinum*) (ATCC 927)

마이코박테리움 울세란스 (*M. ulcerans*) (ATCC 19423)

마이코박테리움 가스트리 (*M. gastri*) (ATCC 15754)

마이코박테리움 테레 (*M. terrae*) (ATCC 15755)

마이코박테리움 레프레 임상검체 (*M. leprae* clinical isolates)

마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체 (*M. tuberculosis* clinical isolates)

실시 예 2: 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출을 위한 프로브 제작

본 발명에 사용된 균주 감별, 항생제 내성 검사, 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 스트레인 감별을 위한 올리고뉴클레오타이드 프로브 제작을 위해 각 유전자에 대해 특이적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드는 퍼킨 - 엘머 DNA 합성기 (Perkin Elmer DNA Synthesis, USA)를 사용해 5' 말단에 15개의 염기를 갖는 길이의 dT 스페이서 및 15 - 25개의 염기서열을 갖는 프로브를 합성하여 PAGE 정제하였다. 마이코박테리아 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검출을 위한 프라이머 및 프로브는 표1, 2, 3의 염기서열에 한정된 것이 아니라 이를 포함한 염기서열로 이루어진 프라이머 및 프로브를 제작하여 이용할 수 있다.

1. 마이코박테리아 균주 감별을 위한 프로브 제작

① 마이코박테리아 속 균주 감별을 위한 프로브 제작

모든 마이코박테리아에서만 혼성화 반응을 하도록 마이코박테리아의 ITS를 표적으로 하여 마이코박테리아에 보존적인 염기서열로 마이코박테리아 균주와 혼성화 반응을 하고 다른 병원성 미생물에 대해서는 혼성화 반응을 하지 않는 마이코박테리아 속 특이적인 ITS 염기서열을 선택하여, 표1의 서열 번호 3에서 9의 MYC - 01에서 MYC - 07까지의 프로브를 제작하였다.

② 결핵균 균주 감별을 위한 프로브 제작

마이코박테리아 속 중에서도 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스에서 혼성화 반응을 하는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스 중 특이적인 프로브는 마이코박테리움 투베르쿨로시스 콤플렉스와 비결핵 마이코박테리아의 ITS 부분의 염기서열을 근거로 하여 표1의 서열 번호 10에서 16의 MTB - 01에서 MTB - 02, MTB - 03, MTB - 04, MTB - 05, MTB - 06, 그리고 MTB - 07 프로브를 제작하였다.

③ 비결핵균 균주 감별을 위한 프로브 제작

비결핵 마이코박테리아 각각의 균에서만 특이적으로 혼성화 반응을 하는 프로브는, 각각의 비결핵 마이코박테리아의 ITS 부분의 중 특이적인 염기서열을 근거로 하여 표 1의 서열번호 17부터 89의 MAC - 01부터 LEP - 04까지 모두 21종의 비결핵 마이코박테리아를 균주 감별하는 73종류의 프로브를 제작하였다.

2. 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브 제작

마이코박테리움 투베르쿨로시스 내의 direct repeat (DR) locus와 DRs 내에 35~41 bp의 다양한 길이로 존재하는 비반복적 스페이서 (nonrepetitive spacer)를 바탕으로 표2의 서열번호 92부터 134까지의 SPO - 01부터 SPO - 43까지 모두 43개의 결핵균을 구별하는 프로브를 제작하였다. 마이코박테리움 투베르쿨로시스 스트레인 감별을 위한 43개의 염기서열은 이미 다수의 인용문헌을 통해 보고되었다 (van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., van Der Zeijst B.A., Schouls L.M. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. J Bacteriol 182: 2393 - 2401 (2000); Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 35: 907 - 914 (1997)).

3. 항생제 내성 검출을 위한 프로브 제작

① 리팜핀 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 검출을 위한 프로브 제작

리팜핀 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 검출을 위해 *rpoB* 유전자에서 리팜핀 내성 결핵균의 90% 이상에서 원인이 된다고 보고된 돌연변이 출현빈도가 높은 코돈 511에서 코돈 533의 69 bp 염기서열을 바탕으로 각각의 돌연변이 검출 프로브에서 점돌연변이 염기서열이 프로브의 중앙부위에 오도록 디자인하였다. (Musser J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 8: 496 - 514(1995); 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석, 김철민, 및 박순규. 염기서열결정과 Line Probe 분석법에 의한 리팜핀 내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석. 결핵 및 호흡기 질환, 44: 251 - 263(1997); Valim A.R., Rossetti M.L., Ribeiro M.O., Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug - resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Brazil. J Clin Microbiol 38: 3119 - 3122(2000)). 그중 코돈 511 부위의 leucine(CTG)이 proline(CCG)으로, 코돈 513 부위의 glutamine(CAA)이 leucine(CTA)으로, 코돈 516 부위의 aspartic acid(GAC)이 valine(GTC)과 tyrosine(TAC)으로, 코돈 522 부위의 serine(TCG)이 leucine(TTG)으로, 코돈 526 부위의 histidine(CAC)이 tyrosine(TAC), aspartic acid(GAC), arginine(CGC), leucine(CTC)과 proline(CCC)으로, 돌연변이 빈도가 가장 높은 코돈 531 부위의 serine(TCG)이 leucine(TTG)과 tryptophan(TGG)으로의 치환과 코돈 533 부위의 leucine(CTG)이 proline(CCG)으로 치환된 점돌연변이를 바탕으로 디자인하여 7종류의 야생형과 총 13종류의 돌연변이를 검출하도록 표 3의 서열번호 137에서 160의 총 24종류의 프로브를 제작하였다.

② 아이소니아지드 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 검출을 위한 프로브 제작

아이소니아지드 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 검출을 위해 아이소니아지드 내성균의 약 70%를 차지하는 *katG* 유전자에서의 돌연변이 출현빈도가 높은 코돈 315와 463의 염기서열을 바탕으로 점돌연변이 염기서열이 중앙에 오도록 프로브를 디자인하였다(Musser J.M., Kapur V., Williams D.L., Kreiswirth B.N., van Soolingen D., van Embden J.D. Characterization of the catalase - peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid - resistant and - susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. J Infect Dis 173: 196 - 202(1996)). 코돈 315 부위의 serine(AGC)이 threonine(ACC)과 asparagine(AAC)으로, 코돈 463 부위의 arginine(CGG)이 leucine(CTG)으로 치환된 점돌연변이를 바탕으로 디자인하여 표 3의 서열번호 165에서 169의 프로브를 제작하여 2종류의 야생형(wild type)과 3종류의 돌연변이를 검출하도록 하였다.

③ 피라진아마이드 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 검출을 위한 프로브 제작

피라진아마이드 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스의 경우 돌연변이가 *pncA* 염기서열 전반에 걸쳐 산재되어 있다. 따라서 프로브 선정시 점돌연변이인 경우로서 상대적으로 돌연변이 출현빈도가 높은 부위인 프로모터의 -11 부위의 A가 G로의 치환을 검출하기 위해 디자인하여 표 3의 서열번호 172에서 173의 프라이머 및 프로브를 제작하여 1종류의 야생형과 1종류의 돌연변이를 검출하도록 하였다.

실시 예 3: 표적 DNA 준비

1. 마이코박테리아 균 균주 감별을 위한 표적 DNA 준비

마이코박테리아 균 균주 감별을 위한 표적 DNA의 증폭을 위해 각각 바이오틴이 표지화된 ITSF 5' biotin - CGA AGC CAG TGG CCT AAC CC - 3' (서열번호1), MYC - 02 5' - biotin - ATG CTC GCA ACC ACT ATC CA - 3' (서열번호 3)과 ITSr 5' - biotin - TGG ATC CTG CCA AGG CAT CCA CCA T - 3' (서열번호2)를 사용하여 16S rRNA와 23S rRNA 일부를 포함하는 300~500 bp 크기의 ITS부위를 선택적으로 증폭하도록 고안된 프라이머를 통상의 방법으로 제작하였다. 실시 예 1에서 분리된 각종 마이코박테리아 표준 균주와 임상 균주를 위의 프라이머를 이용하여 PCR 기법을 실시하였다. PCR은 퍼킨 - 엘머 시터스 씨모사이클러 모델 9600(Perkin - Elmer Cetus Thermocycler Model 9600)에서 충분히 변성시키기 위해 94℃에서 3분간 열처리한 후 94℃에서 1분, 62℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 30회 반응시킨 후, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. 반응 후 2% 아가로스 젤로 전기영동을 실시하여 PCR 반응 산물의 크기를 확인하였다. 이 방법은 인용 문헌으로 개시하고 있는 Park H.K. 등에 의한 문헌 J. Clin. Microbiol. 38: 4080 - 4085 (2000)에 상세히 기재되어 있다.

2. 결핵균의 스트레인 감별을 위한 표적 DNA 준비

마이코박테리움 투베르쿨로시스 스트레인 (strain)의 균주감별을 위한 표적 DNA의 증폭을 위해 여러 논문에 기재된 한 쌍의 프라이머를 각각 바이오틴이 표지화된 DRa 5' - biotin - GGT TTT GGG TCT GAC GAC - 3' (서열번호90)와 D Rb 5' - biotin - CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3' (서열번호91)을 사용하여 다양한 크기의 PCR 산물을 증폭하도록 프라이머를 제작하였다. 실시 예 1에서 분리된 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv 표준 균주와 임상 균주를 위의 프라이머를 이용하여 PCR 기법을 실시하였다. PCR은 퍼킨 - 엘머 시터스 씨모사이클러 모델 9600(Perkin - Elmer Cetus Thermocycler Model 9600)에서 충분히 변성시키기 위해 96℃에서 3분간 열처리한 후 96℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 30초씩 25회 반응시킨 후, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. 반응 후 2% 아가로스 젤로 전기영동을 실시하여 PCR 반응 산물을 확인하였다.

3. 항생제 내성 결핵균의 검출을 위한 표적 DNA 준비

RMP 내성 검사를 위한 rpoB 유전자의 돌연변이 검출을 위한 표적 DNA 증폭을 위해 각각 바이오틴이 부착된 rpoF 5' - biotin - TGC ACG TCG CGG ACC TCC A - 3' (서열번호135)와 rpoR 5' - biotin - TCG CCG CGA TCA AGG AGT - 3' (서열번호136) 프라이머를 약 160 bp 산물을 증폭하도록 고안하여 통상의 방법으로 제작하고, 이를 이용하여 표준 균주인 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis) H37Rv, RMP 내성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)와 RMP 감수성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)를 대상으로 PCR 기법을 실시하였다. 반응 조건은 94℃에서 3분간 반응시켜 충분히 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 62℃에서 30초, 72℃에서 1분씩 35회 반응시켰으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. INH 내성 검사를 위한 katG 돌연변이 검출을 위한 프라이머는 2쌍으로 각각 150 bp의 산물을 증폭하도록 디자인하였다. 바이오틴이 부착된 katG 프라이머는 코돈 315 부위의 PCR 반응을 위하여 kat1F 5' - biotin - AAG AGC TCG TAT GGC ACC GG - 3' (서열번호161)과 kat2R 5' - biotin - AGC GCC AGC AGG GCT CTT C - 3' (서열번호162), 코돈 463 부위의 PCR 반응을 위하여 kat3F 5' - biotin - GGC GAA GCC GAG ATT GCC AG - 3' (서열번호163)과 kat4R 5' - biotin - CTG CAG GCG GAT GCG ACC A - 3' (서열번호164)을 제작하여 표준 균주인 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis) H37Rv, INH 내성의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)와 INH 감수성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)를 대상으로 PCR 기법을 실시하였으며, PZA 내성 검사를 위한 pncA의 프로모터 - 11 지역의 돌연변이 검출에 사용한 프라이머는 표적 DNA를 약 200 bp 크기로 증폭하는 바이오틴이 부착된 pncF 5' - biotin - GCT GGT CAT GTT CGC GAT CG - 3' (서열번호170)과 pncR 5' - biotin - ACC GGT TAC CGC CAG CGA G - 3' (서열번호171) 프라이머를 제작하여 표준 균주인 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis) H37Rv, PZA 내성의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)와 PZA 감수성 마이코박테리움 투베르쿨로시스 임상 검체(M. tuberculosis clinical isolates)를 대상으로 PCR 기법을 실시하였다. 반응 조건은 94℃에서 3분간 충분히 변성시킨 후 94℃에서 1분, 62℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 30회 반응시켰으며, 마지막으로 72℃에서 10분간 연장하였다. 반응이 끝난 후 각각의 증폭 산물은 2% 아가로스 젤에 전기영동 하여 각각 150 bp와 180 bp 크기의 PCR 산물을 확인하였다.

실시 예 4: 지지체에 프로브 부착

실시 예 2에서 제작된 프로브는 100 pmol로 희석하여 96 - well 마이크로플레이트에 옮겨서 Micro - spotting 용액을 첨가하여 30 pmol로 잘 섞었다. 슬라이드 글라스 또는 멤브레인(membrane) 등의 지지체에 프로브를 마이크로어레이어(Cartesian Technologies, PLXSYS 7500 SQXL Microarrayer, USA)를 이용하여 부착시켰다. 사용된 프로브는 각각에 대해 대표적인 한 종류의 프로브를 선정한 것으로, 도 1의 1에서 21에 해당하는 마이코박테리아 균주 감별 프로브는 순서대로 각각 서열번호 4, 13, 17, 25, 27, 31, 38, 43, 44, 49, 51, 54, 59, 62, 65, 71, 75, 77, 81, 88 및 4에 해당되며, 도 1의 49에서 93에 해당하는 결핵균 스트레인 감별 프로브는 차례대로 양성 대조군 프로브, 서열번호 92에서 134와 양성 대조군 프로브에 해당된다. 항생제 내성 검출용 프로브 중 RMP 내성 검출 프로브는 도 1의 22에서 42에 해당되는 것으로 차례대로 양성 대조군 프로브, 서열번호 137에서 153, 156, 159 및 160이며, INH 내성 검출 프로브는 도 1의 43에서 48로 양성 대조군 프로브와 서열번호 165에서 169에 해당되고, PZA 내성 검출 프로브는 도 1의 94에서 96으로 양성 대조군 프로브와 서열번호 172와 173에 해당된다. 한 종류의 프로브 당 두 개의 점(spot)을 지지체에 부착시킨 후, 실온의 슬라이드 박스에서 24시간 정도 정치 또는 50℃의 건조기(dry oven)에 약 5시간 방치하여 지지체 위의 표면에 고정시켰다.

실시 예 5: 고정되지 않은 프로브의 세척

지지체 표면에 부착되지 않은 프로브를 제거하기 위해 실온에서 0.2% SDS(Sodium dodecyl sulfate) 용액에 세척한 후, 증류수로 2회 세척하였다. Sodium borohydride 용액으로 세척하고 다시 끓는 증류수에 세척하였다. 실온에서 0.2% SDS와 증류수를 이용하여 세척한 후 원심분리기를 이용하여 지지체 표면을 완전하게 건조시켜 마이크로어레이 제작을 완료하였다.

실시 예 6: 혼성화 반응 (Hybridization)

실시 예3에서 제조된 바이오틴으로 표지화된 표적 DNA를 단일 가닥으로 사용하기 위해 끓인 후, 4℃로 냉각시켰다. 1~5 μ l의 표적 DNA를 포함하는 혼성화 반응 용액 10 μ l를 제작하였다. 프로브 부착과 세척을 마친 슬라이드에 혼성화 반응 용액을 분주하고 기포가 생기지 않도록 커버 슬립을 덮은 뒤 40℃에서 30분간 반응시켰다.

실시 예 7: 결합되지 않은 DNA의 세척

혼성화 반응을 하지 않은 잔여의 DNA를 세척하기 위해 2× SSC(300mM NaCl, 30mM Na - Citrate, pH 7.0)와 0.2% SDS를 혼합한 용액을 이용하여 커버 슬립을 제거한 후에 2× SSC/ 0.2% SDS 세척 용액과 2× SSC, 그리고 0.2× SSC 용액 순으로 슬라이드를 세척하였다. 마지막으로 원심분리기를 이용하여 세척한 슬라이드를 완전하게 건조시켰다.

실시 예 8: 염료 결합 및 분석

PCR 산물과 프로브와의 결합유무를 확인하기 위해, Cy5 - streptavidin 또는 Cy3 - streptavidin(Amersham pharmacia biotech, USA)을 6 × SSC와 BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용하여 희석한 후 약 40 μ l를 슬라이드에 분주하여 커버 슬립을 덮고 빛을 차단한 후 50℃에서 약 20분간 반응시켰다. 반응 후 슬라이드를 2× SSC 용액을 이용하여 커버 슬립을 제거한 후, 2× SSC, 그리고 0.2 × SSC 용액을 사용하여 세척하였다. 분석을 위해 비공초점 레이저 스캐너(non - confocal laser scanner)인 GenePix 4000A(Axon Instruments, USA)를 이용하여 결과를 분석하였다.

도 2는 하나의 검체로부터 한번의 실험으로 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 동시에 검출하기 위한 각 프로브들의 특이적 혼성화 반응의 결과를 스캐너로 분석한 그림으로 각 프로브에 대해 마이코박

테리아 튜베르쿨로시스 H37Rv를 표적 DNA로 하여 본 발명을 위한 마이크로어레이와의 혼성화 반응을 실시한 결과, 마이코박테리아 균주 감별 결과 도 1에서 1과 21에 해당하는 마이코박테리아 속 검출용 프로브 MYC - 02와 2의 위치에 해당하는 마이코박테리아 튜베르쿨로시스 콤플렉스 검출용 프로브 MTB - 04에서만 특이적으로 혼성화 반응이 일어났음을 확인할 수 있었다. 결핵균 스트레인 감별 결과 도 1의 49와 93 위치의 양성 대조군 프로브와 도 1에서 50에서 92 위치의 SPO - 01, SPO - 03, 04, 05, 06, 08, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 그리고 SPO - 43의 프로브에서 반응이 일어났으며, 항생제 내성 검출 실험에서는 모든 항생제에 감수성을 가진 표준 균주 마이코박테리아 튜베르쿨로시스 H37Rv를 이용한 결과 RMP, INH, PZA 내성 프로브에서 각각 도 1의 22, 43과 94 위치의 양성 대조군 프로브와 RMP는 도 1에서 각각 23, 25, 27, 29, 35와 38에 해당하는 rpo 511 - WL, rpo 513 - WQ, rpo 516 - WD, rpo 522 - WS, rpo 526 - WH, rpo 531 - WD와 rpo 533 - WL에서 반응이 일어났다. 또 다른 항생제인 INH는 도 1에서 각각 44와 47에 해당하는 kat 315 - WS와 kat 463 - W R에서 반응이 일어났으며, PZA는 도 1의 95에 해당하는 pnc - 11 - W에서 반응이 일어났다.

도 3은 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과를 스캐너로 분석한 그림으로, a)는 마이코박테리아 튜베르쿨로시스 H37Rv를 표적 DNA로 하여 본 발명을 위한 마이크로어레이와의 혼성화 반응을 실시한 결과, 도 1의 1과 21에 해당하는 마이코박테리아 속에 특이적으로 반응하는 프로브인 MYC - 02와 도 1의 2에 해당하는 결핵균에 특이적으로 반응하는 프로브 MTB - 04에서만 혼성화 반응이 일어났음을 확인할 수 있었다.

b)는 비결핵 마이코박테리아인 마이코박테리움 스크로푸레시움을 표적 DNA로 하여 마이크로어레이와의 혼성화 반응을 실시한 결과를 나타내는 것으로, 도 1의 1과 21에 해당하는 마이코박테리아 속에만 특이적으로 반응하는 프로브 MYC - 02와 도 1의 9에 해당하는 마이코박테리움 스크로푸레시움 중 특이적인 프로브 SCO - 01에서만 혼성화 반응이 일어났음을 확인할 수 있었다.

도 4는 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과를 나타내는 그림으로, a) 마이코박테리움 튜베르쿨로시스 H37Rv와 b) 마이코박테리움 보비스(M. bovis)를 표적 DNA로 하여 혼성화 반응한 결과 도 1의 49와 93에 해당하는 양성 대조군 프로브와 마이코박테리움 튜베르쿨로시스 H37Rv는 도 1에서 각각 차례대로 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 86, 87, 88, 89, 90, 91과 92에 해당하는 프로브인 SPO - 01, SPO - 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 그리고 SPO - 43의 프로브에서 반응이 일어났으며, 마이코박테리움 보비스(M. bovis)는 도 1에서 각각 차례대로 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 60, 61, 62, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 83, 84, 86와 87에 해당하는 프로브인 SPO - 01, SPO - 03, 04, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37와 SPO - 38 프로브에서만 혼성화 반응이 나타났다.

도 5는 마이코박테리아의 항생제 내성을 위한 프로브의 특이적 혼성화 반응의 결과를 나타내는 그림으로, a) 및 b)는 RMP 내성 검사를 위해 RMP에 대해 감수성(야생형)을 가지는 마이코박테리움 튜베르쿨로시스와 rpoB 유전자의 코돈 526 부위의 histidine(CAC)이 tyrosine(TAC)으로 치환된 내성 균주를 표적 DNA로 하여 실험한 결과 두 균주 모두에서 각각의 프로브를 혼합하여 부착시킨 양성 대조군 프로브에서 혼성화 반응이 일어났으며, RMP 감수성 균주인 마이코박테리움 튜베르쿨로시스 H37Rv의 경우 각 코돈의 야생형 프로브인 도 1의 23, 25, 27, 30, 32, 38와 41에 각각 해당하는 rpo 511 - WL, rpo 513 - WQ, rpo 516 - WD, rpo 522 - WS, rpo 526 - WH, rpo 531 - WD와 rpo 533 - WL에서 반응이 일어나고, 코돈 526 부위의 histidine(CAC)이 tyrosine(TAC)으로 치환된 내성 균주는 도 1의 23, 25, 27, 30, 38, 41과 30에 각각 해당하는 rpo 511 - WL, rpo 513 - WQ, rpo 516 - WD, rpo 522 - WS, rpo 531 - WD, rpo 533 - WL과 rpo 526 - MY에서 특이적인 혼성화 반응 결과를 확인할 수 있었다.

c) 및 d)는 INH 내성 검사를 위해 INH에 대해 감수성을 나타내는 마이코박테리움 튜베르쿨로시스와 katG 유전자의

코돈 315 부위의 serine(AGC)이 threonine(ACC)으로 치환된 내성 균주를 표적 DNA로 하여 실험한 결과 모두에서 각각의 프로브 모두를 혼합한 양성 대조군 프로브에서 혼성화 반응이 일어났으며 INH 감수성 균주는 코돈 315와 463의 야생형 프로브인 도 1의 44와 47에 해당하는 kat 315 - WS와 kat 463 - WR에서만, 내성 균주는 도 1의 45와 47에 해당하는 kat 315 - MT와 kat 463 - WR 프로브에서 특이적인 혼성화 반응 결과를 확인할 수 있었다.

e) 및 f)는 PZA 감수성의 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv와 pncA 프로모터의 - 11 부위의 A가 G로의 치환된 내성 균주를 표적 DNA로 하여 실험한 결과로 감수성 균주는 각 프로브 모두를 혼합한 양성 대조군 프로브와 도 1의 95에 해당하는 pnc - 11 - W의 야생형 프로브에서만 반응이 일어났으며 감수성의 경우 양성 대조군 프로브와 도 1의 96에 해당하는 pnc - 11 - M의 돌연변이 검출 프로브에서 특이적인 혼성화 반응 결과를 확인할 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 마이크로어레이는, 하나의 지지체 위에 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 검사할 수 있는 프로브 모두를 포함하고 있어서 단 1회의 혼성화 반응으로 마이코박테리아 속 여부와 결핵균과 비결핵균 21 종을 동시에 검출할 수 있다. 또한 마이코박테리움 투베르쿨로시스 스트레인을 감별할 수 있으며, 항생제 내성 중 RMP, INH와 PZA 내성 결핵균의 일부를 검출할 수 있다. 또한 하나의 고형지지체 위에 다수의 세트로 부착하여 한번의 실험으로 다수의 검체로부터 동시에 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성에 대한 실험이 가능하여 검사 시간과 비용 면에서도 매우 경제적이다. 이는 기존의 배양 균주 뿐만 아니라 임상 검체를 직접 표적으로 이용하므로 진단에 필요한 시간을 기존의 상품화 된 방법보다 훨씬 단축시킬 수 있다. 따라서 본 발명의 마이크로어레이는 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성 검사를 단시간에 결과를 얻을 수 있어 경제적이며 효과적으로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

지지체에 부착된 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브(probes), 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브, 및 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 마이크로어레이.

청구항 2.

제1항에 있어서, 하나의 지지체에 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별과 항생제 내성을 검출하는 프로브(probes)를 한 세트로 하는 다수의 세트로 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서, 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브는 마이코박테리아 속 특이적인 ITS(Internal Transcribed Spacer) 염기서열의 올리고뉴클레오티드, 결핵 마이코박테리아 중 특이적인 ITS 염기서열의 올리고뉴클레오티드, 및 비결핵 마이코박테리아 중 특이적인 ITS 염기서열의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서, 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프로브는 서열번호 1 내지 9의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 서열번호 10 내지 16의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 및 서열번호 17 내지 89의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 5.

제1항 또는 제2항에 있어서, 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브는 결핵균의 스트레인 특이적 DR(direct repeat) 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 6.

제1항 또는 제2항에 있어서, 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프로브는 서열번호 90 내지 134의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 7.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브는 리팜핀, 아이소니아지드 및 피라진아마이드에 대한 내성을 동시에 검출하기 위한 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 8.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브는 리팜핀 내성을 유도하는 *rpoB* 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 아이소니아지드 내성을 유도하는 *katG* 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 피라진아마이드 내성을 유도하는 *pncA* 유전자의 점돌연변이 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이

청구항 9.

제1항 또는 제2항에 있어서, 항생제 내성을 검출하기 위한 프로브는 서열번호 135 내지 160의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 서열번호 161 내지 169의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드, 서열번호 170 내지 173의 염기서열을 포함하는 1종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로어레이.

청구항 10.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 마이크로어레이를 이용하여 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별, 결핵균의 스트레인 감별, 및 항생제의 내성 검출을 동시에 수행하는 검출 방법.

청구항 11.

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 마이크로어레이를 포함하는 결핵 및 비결핵 마이코박테리아 감염 진단 키트.

청구항 12.

서열 번호 1 내지 89의 염기서열을 포함한 결핵 및 비결핵 마이코박테리아의 균주 감별을 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오티드.

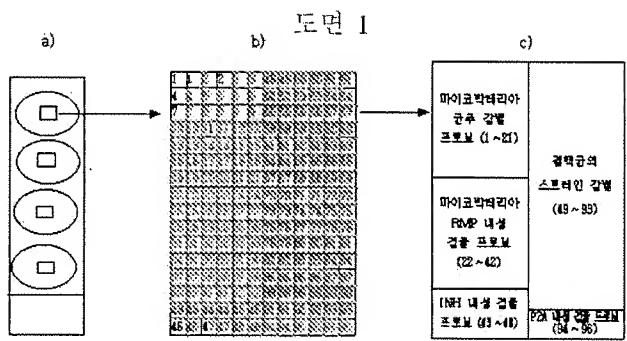
청구항 13.

서열 번호 90 내지 134의 염기서열을 포함한 결핵균의 스트레인 감별을 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오티드.

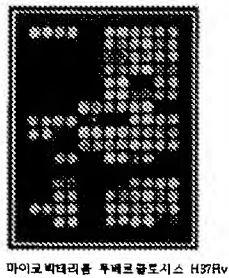
청구항 14.

서열 번호 135 내지 173의 염기서열을 포함한 항생제 내성을 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브용 올리고뉴클레오티드.

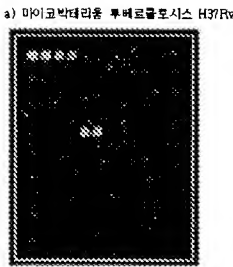
도면



도면 2

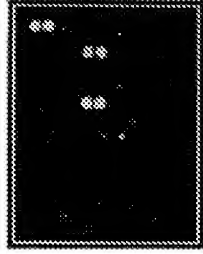


도면 3a



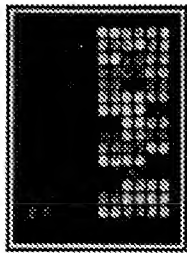
도면 3b

b) 마이코박테리움 스크로푸테시움



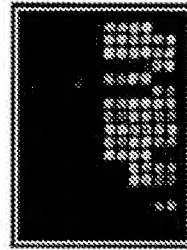
도면 4a

a) 마이코박테리움 루베크로글로시스 H37Rv



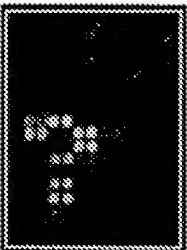
도면 4b

b) 마이코박테리움 보비스(M. bovis)



도면 5a

a) 마이코박테리움 루베크로글로시스 H37Rv
(HMP 감수성 군주)



도면 5b

b) 마이코박테리움 투베르쿨로시스
(RMP 내성 균주)



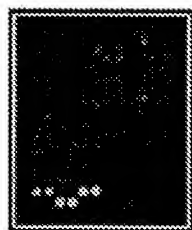
도면 5c

c) 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv
(INH 감수성 균주)



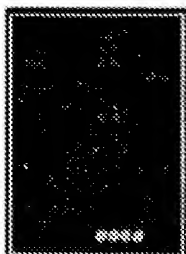
도면 5d

d) 마이코박테리움 투베르쿨로시스
(INH 내성 균주)



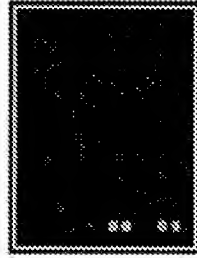
도면 5e

e) 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv
(PZA 감수성 균주)



도면 5f

f) 마이코박테리움 투베르쿨로시스
(PZA 내성 균주)



<110>	SJ HIGHTECH Co., Ltd.	
<120>	Microarray comprising probes for Mycobacteria genotyping, M. tuberculosis strain differentiation and antibiotic-resistance detection	
<160>	173	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	1	
	cgaagccagt ggcctaaccc	20
<210>	2	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	2	
	tggatcctgc caaggcatcc accat	25
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	3	
	tggtgggggtg tggtgtttga	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	4	
	tggatagtgg ttgcgagcat	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	5	
	tggatagtga ttgcgagcat	20

<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	6	
tg gat agt gc	tt gc gag cat	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	7	
tg gat agt gg	tt gag ag cat	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	8	
tg gat agt gg	tt ggg ag cat	20
<210>	9	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Mycobacteria	
<400>	9	
at agt gat tg	cg agc	15
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	10	
ca ct cgg act	tgt tcc aggt	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	11	
tg gt ggg gcg	tag gcc gt ga	20
<210>	12	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	12	
ca caa agt t	gg cca	15
<210>	13	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	13	
gg act tgt tc	c aggt	15
<210>	14	
<211>	15	

<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	14	
aggtgttgtc	ccacc	15
<210>	15	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	15	
tgcatgacaa	caaag	15
<210>	16	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	TB complex	
<400>	16	
aggtgttntc	ccacc	15
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	MAC	
<400>	17	
ccctgagaca	acactcggtc	20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	MAC	
<400>	18	
gcgttcacgc	aaatgtgtaa t	21
<210>	19	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	MAC	
<400>	19	
ctcggtcgaa	ccgtg	15
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	20	
ccgtgaggaa	ccggttgccct	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	21	
tagcacgcag	aatcgtgtgg	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	

<400>	22	
gtagtgggca cggtttggtg		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	23	
caaacttttt tgactgccag		20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	24	
aggcccgtgc cccttttggg		20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	25	
tggcatccgg ttgcgggtgt		20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. fortuitum	
<400>	26	
ggttttgtgt gttgatgtgc		20
<210>	27	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. chelonae	
<400>	27	
gtggttactc gcttggt		17
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. chelonae	
<400>	28	
ttgggaacat aaagcgagtt		20
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	M. chelonae	
<400>	29	
caatagaatt gaaacgctgg ca		22
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. chelonae	
<400>	30	
gtagtcggca aaacgtcgga		20

<210>	31	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. abscessus	
<400>	31	
taaagtaggc atctg		15
<210>	32	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. abscessus	
<400>	32	
ggatatctac ttggt		15
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. abscessus	
<400>	33	
taaacatagc ctcgctcggt		20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. gordonae	
<400>	34	
cgacaacaag ctaagccaga		20
<210>	35	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. gordonae	
<400>	35	
aaaatgtatg cgttg		15
<210>	36	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. gordonae	
<400>	36	
tgtcgttcgc ggcaacgt		18
<210>	37	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. gordonae	
<400>	37	
caccctcggg tgctgtc		17
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	38	
gcgcaactgt aaatgaatca		20
<210>	39	
<211>	19	

<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	39	
ctggatgcgc	tgccgttcg	19
<210>	40	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	40	
aactgtaa	aat gaatcaccaa cac	23
<210>	41	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	41	
ggacgaaagc	cgggtgcac	19
<210>	42	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	42	
gcatcccaac	aagtggg	17
<210>	43	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. kansasii	
<400>	43	
ctcgggctct	gttcgag	17
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. scrofulaceum	
<400>	44	
tcggctcggtt	ctgagtgggtg	20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. scrofulaceum	
<400>	45	
taaacggatg	cgtggccgaa	20
<210>	46	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. szulgai	
<400>	46	
aacactcagg	cttggccaga	20
<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. szulgai	

<400>	47	
caattggatg cgctgccctc		20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. szulgai	
<400>	48	
gcgcgggaac gaacaagcca		20
<210>	49	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. szulgai	
<400>	49	
aggcttggcc agagctgttg		20
<210>	50	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. vaccae	
<400>	50	
cgattcgttg gatggccttt		20
<210>	51	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. vaccae	
<400>	51	
aatgccggcg agggaaat		18
<210>	52	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. vaccae	
<400>	52	
gaatgcacag cgcttgtggt		20
<210>	53	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. xenopi	
<400>	53	
gggccgaggt gttgggcag		19
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. xenopi	
<400>	54	
caggcagtaa ccgccggcac		20
<210>	55	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. xenopi	
<400>	55	
tgttgagtgt tttctggtgt		20

<210>	56	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	M. xenopi	
<400>	56	
	agactgtggg aagcgggttt tg	22
<210>	57	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. terrae	
<400>	57	
	ctttttcccc cgtgcctcac	20
<210>	58	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	M. terrae	
<400>	58	
	caacgttgaa aacaagatcg cc	22
<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. terrae	
<400>	59	
	aggagtcctt ggggggtttct	20
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. terrae	
<400>	60	
	ggcaacaggc ccgtttgtgc	20
<210>	61	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. flavescens	
<400>	61	
	acgtgtgtgg gatcagtgcg	20
<210>	62	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	M. flavescens	
<400>	62	
	cactgctttg aggaatcatc ag	22
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. flavescens	
<400>	63	
	ctgaacagggt ggctcccttt t	21
<210>	64	
<211>	19	

<212>	DNA	
<213>	<i>M. smegmatis</i>	
<400>	64	
acactctccg	ttggggagg	19
<210>	65	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. smegmatis</i>	
<400>	65	
ctgtttcgat	ggactgccag	20
<210>	66	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. smegmatis</i>	
<400>	66	
cgcggttccc	gtcccgttg	19
<210>	67	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. smegmatis</i>	
<400>	67	
cgcattgttg	cggacaaatt g	21
<210>	68	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. genavense</i>	
<400>	68	
aacaacaggc	aatcgccgga	20
<210>	69	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. genavense</i>	
<400>	69	
gttccccagt	ggtgcgcgt	19
<210>	70	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. malmoense</i>	
<400>	70	
tggtggggtg	caagccgtga	20
<210>	71	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. malmoense</i>	
<400>	71	
tgcccgtaga	cgcgtattcg	20
<210>	72	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	<i>M. malmoense</i>	

<400>	72	
tcggccagtc	cgcgt	15
<210>	73	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. simiae	
<400>	73	
cacaacaaca	ggcaatcgcc a	21
<210>	74	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. simiae	
<400>	74	
actcggccga	cttcggttga	20
<210>	75	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. simiae	
<400>	75	
cgagcatcta	aatgaacgcg t	21
<210>	76	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. simiae	
<400>	76	
cttcggttga	agtgg	15
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. marinum - M. ulcerans	
<400>	77	
aacaacaagc	aagccagaca c	21
<210>	78	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. marinum - M. ulcerans	
<400>	78	
gcaacatctc	tgttggtttc	20
<210>	79	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. marinum - M. ulcerans	
<400>	79	
ccttttggtg	gcgtgttctg t	21
<210>	80	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	80	
caacagcaag	caagcca	17

<210>	81	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	81	
cgccaagag tggtg		15
<210>	82	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	82	
ttgtcttgga ctcgt		15
<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	83	
gcagggtagc gtgttctttt g		21
<210>	84	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	84	
gttgcccgcga gggtagcg		18
<210>	85	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. gastri	
<400>	85	
tgcccgcagg gtagcgtgt		19
<210>	86	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. leprae	
<400>	86	
acactctaaa tagttag		18
<210>	87	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	M. leprae	
<400>	87	
gcaaatatcc agacac		16
<210>	88	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	M. leprae	
<400>	88	
ttgtccctca tctttgg		17
<210>	89	
<211>	24	

<212>	DNA	
<213>	M. leprae	
<400>	89	
aacactctaa atagtttagg gtat		24
<210>	90	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	90	
ggttttgggt ctgacgac		18
<210>	91	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	91	
ccgagagggg acggaaac		18
<210>	92	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	92	
atagagggtc gccggttctg gatca		25
<210>	93	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	93	
cctcataatt gggcgacagc ttttg		25
<210>	94	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	94	
ccgtgcttcc agtgatcgcc ttcta		25
<210>	95	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	95	
acgtcatacg ccgaccaatc atcag		25
<210>	96	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	96	
ttttctgacc acttgtgcgg gatta		25
<210>	97	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	

<400>	97	
cgtcgtcatt tccggcttca atttc		25
<210>	98	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	98	
gaggagagcg agtactcggg gctgc		25
<210>	99	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	99	
cgtgaaaccg cccccagcct cgccg		25
<210>	100	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	100	
actcgggaatc ccatgtgctg acagc		25
<210>	101	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	101	
tcgacaccg ctctagttga cttcc		25
<210>	102	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	102	
gtgagcaacg gcggcggcaa cctgg		25
<210>	103	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	103	
atatctgctg cccgcccggg gagat		25
<210>	104	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	104	
gaccatcatt gccattccct ctccc		25
<210>	105	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	105	
ggtgtgatgc ggatggtcgg ctcgg		25

<210>	106	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	106	
	cttgaataac gcgcagtgaa tttcg	25
<210>	107	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	107	
	cgagttcccg tcacggtcgt aaatc	25
<210>	108	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	108	
	gcgccggccc gcgcggatga ctccg	25
<210>	109	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	109	
	catggacccg ggcgagctgc agatg	25
<210>	110	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	110	
	taactggctt ggcgctgatc ctggt	25
<210>	111	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	111	
	ttgacctcgc caggagagaa gatca	25
<210>	112	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	112	
	tcgatgtcga tgtcccaatc gtcga	25
<210>	113	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	113	
	accgcagacg gcacgattga gacaa	25
<210>	114	
<211>	25	

<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	114	
agcatcgctg atgcggtcca gctcg		25
<210>	115	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	115	
cgcctgctg ggtgagacgt gctcg		25
<210>	116	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	116	
gatcagcgac caccgcaccc tgtca		25
<210>	117	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	117	
cttcagcacc accatcatcc ggcgc		25
<210>	118	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	118	
ggattcgtga tctcttcccg cggat		25
<210>	119	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	119	
tcgcccggcg tttagcgatc acaac		25
<210>	120	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	120	
aaatacaggc tccacgacac gacca		25
<210>	121	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	121	
ggttgccccg cgcccttttc cagcc		25
<210>	122	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	

<400>	122	
tcagacaggt tcgcgtcgat caagt		25
<210>	123	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	123	
gaccaaataag gtatcggcgt gttca		25
<210>	124	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	124	
gacatgacgg cggtgccgca cttga		25
<210>	125	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	125	
aagtcacctc gccacaccg tcgaa		25
<210>	126	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	126	
tccgtacgct cgaaacgctt ccaac		25
<210>	127	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	127	
cgaaatccag caccacatcc gcagc		25
<210>	128	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	128	
cgcgaaactcg tccacagtcc ccctt		25
<210>	129	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	129	
cgtggatggc ggatgcgttg tgcgc		25
<210>	130	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	130	
gacgatggcc agtaaactcg cgtgg		25

<210>	131	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	131	
	cgccatctgt gcctcataca ggtcc	25
<210>	132	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	132	
	ggagctttcc ggcttctatc aggta	25
<210>	133	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	133	
	atggtgggac atggacgagc gcgac	
<210>	134	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	134	
	cgcagaatcg caccgggtgc gggag	25
<210>	135	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	135	
	tgcacgtcgc ggacctcca	19
<210>	136	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	136	
	tcgccgcgat caaggagt	18
<210>	137	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	137	
	agccagctga gccaa	15
<210>	138	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	138	
	agccagccga gccaa	15
<210>	139	
<211>	15	

<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	139	
ctgagccaat tcatg		15
<210>	140	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	140	
ctgagcctat tcatg		15
<210>	141	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	141	
ttcatggacc agaac		15
<210>	142	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	142	
ttcatggtcc agaac		15
<210>	143	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	143	
ttcatgtacc agaac		15
<210>	144	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	144	
ctgtcgggggt tgac		14
<210>	145	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	145	
ctgttgggggt tgac		14
<210>	146	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	146	
ttgaccaca agcgc		15
<210>	147	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	

<400>	147	
ttgacctaca agcgc		15
<210>	148	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	148	
ttgaccgaca agcgc		15
<210>	149	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	149	
ttgacccgca agcgc		15
<210>	150	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	150	
ttgaccctca agcgc		15
<210>	151	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	151	
ttgaccccca agcgc		15
<210>	152	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	152	
cgactgtcgg cgctg		15
<210>	153	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	153	
cgactgttgg cgctg		15
<210>	154	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	154	
cccagcgcca acagtcggc		19
<210>	155	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	155	
cgactgtggg cgctg		15

<210>	156	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	156	
ccgactgtga gcgct		15
<210>	157	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	157	
gccgactatg ggcgc		15
<210>	158	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	158	
cccagcgccc acagtcggc		19
<210>	159	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	159	
ggcgctgggg cccgg		15
<210>	160	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	160	
ggcgccgggg cccgg		15
<210>	161	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	161	
aagagctcgt atggcaccgg		20
<210>	162	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	162	
agcgccagca gggctcttc		19
<210>	163	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	163	
ggcgaagccg agattgccag		20
<210>	164	
<211>	19	

<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	164	
ctgcaggcgg atgcgacca		19
<210>	165	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	165	
atcaccagcg gcatc		15
<210>	166	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	166	
atcaccaccg gcatc		15
<210>	167	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	167	
atcaccaacg gcatc		15
<210>	168	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	168	
cagatccggg catcg		15
<210>	169	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	169	
cagatcctgg catcg		15
<210>	170	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	170	
gctgggcatg ttcgcgatcg		20
<210>	171	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	171	
accggttacc gccagcgag		19
<210>	172	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	

<400>	172	
acgtatggtg gacgt		15
<210>	173	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	M. tuberculosis	
<400>	173	
acgtgtggtg gacgt		15